

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12N 15/37, 5/16, 5/18, 15/63, A01K 67/027		A1	(11) 国際公開番号 WO00/20599
			(43) 国際公開日 2000年4月13日(13.04.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05423			帶刀益夫(OBINATA, Masuo)[JP/JP]
(22) 国際出願日 1999年10月1日(01.10.99)			〒980-0871 宮城県仙台市青葉区八幡5-3-10-402 Miyagi, (JP)
(30) 優先権データ 特願平10/296138 特願平10/296139		JP	(74) 代理人 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160-0004 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ワイエヌテクノロジー研究所 (YS NEW TECHNOLOGY INSTITUTE INC.)[JP/JP] 〒329-0512 栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林 519番地 Tochigi, (JP)		JP	(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, FI, FR, GB, IT, NL, SE)
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 細谷健一(HOSOYA, Kenichi)[JP/JP] 〒982-0826 宮城県仙台市太白区三神峰1丁目3番地 3-501号 Miyagi, (JP)			添付公開書類 国際調査報告書
寺崎哲也(TERASAKI, Tetsuya)[JP/JP] 〒981-3101 宮城県仙台市泉区明石南2-1-5 Miyagi, (JP)			
上田正次(UEDA, Masatsugu)[JP/JP] 〒350-1151 埼玉県川越市今福1672-1-719 Saitama, (JP)			

(54)Title: ESTABLISHED CELLS

(54)発明の名称 樹立細胞

(57) Abstract

Established cells derived from the retinal capillary endothelial cells, choroid plexus epithelial cells or brain capillary endothelial cells of a transgenic animal carrying a large T antigen gene of an SV40 temperature sensitive mutant tsA58. The cell line derived from the retinal capillary endothelial cells expresses the temperature sensitive SV40 large T antigen, a GLUT-1 carrier and a p-glycoprotein. The cell line derived from the choroid plexus epithelial cells expresses the temperature sensitive SV40 large T antigen gene and shows the localization of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase and the GLUT-1 carrier in the cell membrane. When cultured in a monolayer, it shows the localization of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase in the apical side. The cell line derived from the brain capillary endothelial cells expresses the temperature sensitive SV40 large T antigen, the GLUT-1 carrier, the p-glycoprotein, alkaline phosphatase and  $\gamma$ -glutamyltransferase. A method for establishing immortalized cells by subculturing cells obtained from the retinal capillary endothelial cells, choroid plexus epithelial cells or brain capillary endothelial cells of the above-described transgenic animal. These cells are useful in screening drugs regarding the safety or efficacy thereof and studying for developing methods for the diagnosis or treatment of diseases relating to nutritional metabolism in retinal tissues and brain at the cellular level.

(57)要約

SV40温度感受性突然変異性 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジェニック動物の網膜毛細血管内皮細胞由来、脈絡叢上皮細胞由来、又は脳毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞の提供。

網膜毛細血管内皮細胞由来株は、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する。脈絡叢上皮細胞由来株は、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $Na^+ - K^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $Na^+ - K^+$  ATPaseが局在する。脳毛細血管内皮細胞株は、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、p-糖蛋白質、アルカリフォスファターゼ及び $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼを発現する。

前記トラスジェニック動物の網膜毛細血管内皮細胞、脈絡叢上皮細胞、又は脳毛細血管内皮細胞から得られる細胞を継代培養して不死化細胞を樹立する方法。

医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、網膜組織や脳の栄養代謝等に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スードン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロ伐キア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シェラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	スウェーデン
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TG	トーゴー
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドバ	TZ	タンザニア
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
CA	カナダ	HR	クロアチア	共	共和国	TT	トリニダッド・トバゴ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	UA	ウクライナ
CG	コンゴー	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	VN	ヴィエトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴースラビア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CL	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## 樹立細胞

技術分野

本発明は、SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物から樹立された不死化細胞に関する。

より具体的には、本発明は、そのトランスジェニック動物の網膜毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。

本発明の網膜毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞は、シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給と代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。又、グリア細胞の一種のミューラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞株は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持、網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

また、本発明は、そのトランスジェニック動物の脈絡叢上皮細胞由来の樹立細胞に関する。

本発明の脈絡叢上皮細胞由来の樹立細胞は、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究や脳脊髄での物質代謝や透過の防御機構の研究に活用することできる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発の細胞レベルでの研究に有用である。

さらに、本発明は、そのトランスジェニック動物の脳毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。

本発明の脳毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞は、血液から脳組織への物質移行を制限している血液脳関門の研究、即ち、脳の栄養代謝研究や脳内への薬物透過研究および血液脳関門における防御機構の研究に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断やその治療方法の開発の細胞レベルでの研究に有利である。

#### 背景技術

従来、医薬品の安全性や有効性を精査する試験は、主に動物を用いて行なわれていた。しかし、動物愛護の観点から大量の動物を使用することを避け、培養細胞等を用いて試験管内で医薬品の有効性や安全性を試験する技術の実用レベルでの活用が開始されている。例えば、生体組織から採取した初代細胞や無限増殖する樹立培養細胞を用いる方法で予め試験した後に動物試験を行なうことがなされている。しかし、初代細胞は初期段階ではよく増殖するが、継代とともに次第に増殖が停止し、やがては死滅する（この現象を細胞老化と呼ぶ）。更に、初代細胞の特性は、生体組織から採取する度にその特性が異なる危惧に加え、その細胞特性も継代とともに変化することが指摘されている。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合には、試験に供するに足る初代細胞を得ることは非常に難しい。一方、初代細胞の継代を重ねるなかで、細胞老化を免れて無限増殖する能力を獲得した樹立細胞では、安定して均一の特性を持つが、この様な細胞の多くは、その細胞が生体において本来有していた形態や機能の一部或いはその全てを喪失しているため、この様な細胞株を用いた場合には、その細胞株の由来する組織での本来の特性を正確に反映することは難しかった。そこで、初代細胞にras やc-mycなどの発癌遺伝子、アデノウイルスの E1A遺伝子、SV40ウイ

ルスのラージT抗原遺伝子、ヒトパピローマウイルスの HPV16遺伝子等を導入して細胞を形質転換し、初代細胞の有する活発な増殖能を継続的に保持し、しかも継代することによってもその細胞固有の特性を喪失しない不死化細胞を樹立する試みがなされている。ところが、この様な不死化細胞においても、対象とする臓器によっては、その初代細胞を調製し、これらの癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入する時点で、すでに幾つかの機能を喪失するため、本来の機能を保持する厳密な意味での不死化細胞の取得は困難であった。特に、増殖速度が非常に遅い場合や微小器官に由来する場合の初代細胞を調製して株化することは極めて困難であった。

これに対し、近年確立された動物個体への遺伝子導入技術を用いて、個々の細胞に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を導入するかわりに、これらの遺伝子を安定的に染色体に組み込んだ遺伝子導入動物を作製して、個体の発生時点において既に癌遺伝子やラージT抗原遺伝子を細胞の中に保有する動物の臓器から初代細胞を調製して、これを継代することにより不死化細胞を樹立する方法が報告されている。特に、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは、その臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現は、温度を変えることによって操作することができるため非常に有効である (Noble M. et al. (1995) *Transgenic Research* 4, 215-225; Obinata M. (1997) *Genes to Cells* 2, 235-244)。マウスに比べ体重が約10倍あるラットは、各種臓器からの細胞株の樹立に供する細胞を調製する上で、特に、網膜毛細血管内皮細胞あるいは脳内のような微小器官に由来する細胞（例えば脈絡叢上皮細胞、毛細血管内皮細胞など）を株化する場合には、器官あるいは組織を分離して初代細胞あるいは多数の細胞を容易に得ることができるため有利である。そこで、各種臓器から不死化細胞を容易に得ることができ、得られた細胞の増殖や分化形質の発現が温度を変えることによって操作

することができる不死化細胞の樹立に有効なSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットを既に作製した。

一方、血液眼関門の研究において、動物愛護の観点から動物試験に替わる網膜毛細血管内皮の初代細胞を用いる方法が試みられるようになってきている。この場合に、試験に供するに足る細胞を小型の実験動物から得ることが難しいため、ウシ等の大型の家畜の眼球を使用しなければならない。例えば、20個のウシの眼球から網膜毛細血管内皮細胞を単離して2回の継代培養を行なっても約 $9 \times 10^6$ 個の細胞しか得られず (Wong H. C. et al. (1987) Invest. Ophthalmol. Visual. Sci., 28, 1767-1775)、医薬品のスクリーニングには大量のウシの眼球が必要であった。このため、これに替わる有効な網膜毛細血管内皮細胞株の提供が切望されていた。

また同様に、神経作用性の薬物の血液脳脊髄関門防御機構に対する作用機作の研究において、動物愛護の観点から動物試験に替わる脈絡叢上皮細胞の初代細胞を用いる方法が試みられている。この場合には、試験に供するに足る細胞を恒常に小型実験動物から得ることが難しいため、これに替わる有効な細胞株が切望されていた。

さらに、血液脳関門の防御機構に対する薬物の脳内への移行や作用機構の解明は薬物の毒性研究において、動物愛護の観点から動物試験に替わる脳血管内皮細胞の初代細胞を用いる方法が試みられている。この場合には、試験に供するに足る細胞を恒常に得ることが難しいため、これに替わる有効な細胞株が切望されていた。

### 発明の開示

本発明者らは、このような状況に鑑み銳意研究の結果、不死化遺伝子を導入したトランスジェニックラットの網膜組織から網膜毛細血管を分離し、得られた毛細血管から網膜毛細血管内皮細胞を分離することにより、不死化細胞を樹立する

に至った。

従って本発明は、網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞を得ることを課題とする。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を用いて不死化細胞の樹立方法を提供することを課題とする。

さらに、本発明者らは、不死化遺伝子を導入したトランスジェニックラットの脳の脈絡叢から上皮細胞株を分離し、不死化細胞を樹立するに至った。

従って本発明は、脈絡叢上皮細胞由来であって温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseが局在する樹立細胞を得ることを課題とする。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を用いて、このような不死化細胞を樹立する方法を提供することを課題とする。

また同様に、本発明者らは、不死化遺伝子を導入したトランスジェニックラットの脳から脳毛細血管を分離し、得られた毛細血管から脳毛細血管内皮細胞を分離することにより、不死化細胞を樹立するに至った。

従って本発明は、脳毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、p-糖蛋白質、アルカリホスファターゼ、及び $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼを発現する樹立細胞を得ることを課題とする。

また、本発明は、SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を用いて不死化細胞の樹立方法を提供することを課題とする。

本発明は、このような課題を解決するためになされたものであってSV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物から樹立された不死化細胞に関する。具体的には、本発明は、このようなトラン

スジェニック動物の網膜毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。詳しくは、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞に関する。このような樹立細胞としては、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術院研究所に受託番号 FERM BP-6507 として寄託された細胞を挙げることができる。

また、本発明は、このようなトランスジェニック動物の網膜組織をホモゲナイズして毛細血管を分離し、得られた網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養することによって不死化細胞を樹立する方法に関する。このようなトランスジェニック動物としてはラットを例示することができる。

さらに、本発明は、このような樹立方法で樹立された細胞に関する。

本発明のこのような樹立細胞は、シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給及び代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。また、グリア細胞の一種のミューラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持、網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

また、本発明は、このようなトランスジェニック動物の脈絡叢上皮細胞由来の樹立細胞に関する。詳しくは、温度感受性 SV40 ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseが局在する樹立細胞に関する。このような樹立細胞としては日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術院研究所に受託番号 FER

ERM BP-6508 として寄託された細胞を例示することができる。

本発明は、このようなトランスジェニック動物の脈絡叢組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞の中から上皮細胞様に敷石状の形態を示す細胞を継代培養することによりなる不死化細胞の樹立方法に関する。このようなトランスジェニック動物としてはラットを例示することができる。

さらに、本発明は、このようにして樹立された細胞に関する。

本発明のこのような樹立細胞は、多孔性平面膜上で単層培養すると細胞が相互に結合して閉鎖帯を形成し、表裏極性をもつ血液脳脊髄液関門を試験管内で再構築することができるため、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究、脳脊髄での物質代謝あるいは透過の防御機構の研究に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝、恒常性機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

さらに、本発明は、このようなトランスジェニック動物の脳毛細血管内皮細胞由来の樹立細胞に関する。詳しくは、温度感受性 SV40 ラージT抗原遺伝子を発現し、アルカリホスファターゼ、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ活性を保持し、スカベンジャー受容体、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞に関する。このような樹立細胞としては日本通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-6873 として寄託された細胞株を例示することができる。

本発明は、このようなトランスジェニック動物の脳組織から脳毛細血管を分離し、得られた毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞の中から内皮細胞特異的なスピンドルファイバー状の形態を示す細胞を継代培養することによりなる不死化細胞の樹立方法に関する。このようなトランスジェニック動物としてはラットを例示することができる。

さらに、本発明はこのようにして樹立された細胞に関する。

本発明のこのような樹立細胞は、多孔性平面膜上で単層培養すると細胞が相互に結合して、表裏極性をもつ血液脳関門を試験内で再構築することができるため、血液から脳組織への物質移行を制限している血液脳関門の研究、即ち、脳の栄養代謝研究や脳内への薬物透過研究および血液脳関門における防御機構の研究に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断やその治療方法の開発の細胞レベルでの研究に有利である。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の実施例5の樹立細胞(TR-iBBB2)の3-OMGの取り込み速度の基質濃度依存性を示す。

第2図は、本発明の実施例10の樹立細胞(TR-CSFB3)の $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseの共焦点レーザースキャン顕微鏡写真を示す。

上の写真は上面からみた顕微鏡写真で $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及び GLUT-1の発現がみられる。下の写真は、断面の顕微鏡写真で頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseが局在している。

第3図は、本発明の実施例11の樹立細胞株(TR-CSFB3)のプロリン能動輸送能を示す。

第4図は、本発明の実施例12の樹立細胞(TR-CSFB3)のプロリン能動輸送能のコリン、ウアバインによる阻害を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明で使用するSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラットは、以下のように得ることができる。即ち、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を、例えば、SV40の複製起点(ori)を欠失させたtsA58ori(-)-2株の全ゲノムDNAを制限酵素 BamHI

で開環して pBR322 に導入したプラスミド pSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991)) を常法に従い大腸菌内で大量に増幅させる。このようにして調製したプラスミドを制限酵素 BamHIで切断してベクター部位を除去する。この様にして得られたtsA58 のラージ T 抗原遺伝子を持つDNA(5,240bp)には、ラージ T 抗原遺伝子のプロモーターが内在するため、このDNAを導入したラットにおいては、その全ての体細胞においてこの遺伝子(tsA58のラージ T 抗原遺伝子) が発現することになる。

次に、この様にして得られたDNAを常法に従いラットの全能性細胞に導入して温度感受性ラージ T 抗原遺伝子を全ての細胞内に有する遺伝子導入ラットを作製する。全能性細胞としては、受精卵や初期胚のほか多分化能を有するES細胞

が挙げられる。この様な卵子や培養細胞へのDNA導入法はマイクロインジェクション法、電気パルス法、リボソーム法、リン酸カルシウム法等が利用できる。

更に、所望する本遺伝子を導入した培養細胞の核を除核未受精卵に移植して初期化すること（核移植）で卵子に本遺伝子を導入することができる。しかし、遺伝子導入ラットを得る効率からは、現在のところ前核期受精卵の雄性前核に本遺伝子をマイクロインジェクションして得られる卵子を仮親の卵管に移植して産仔を得た後、注入遺伝子を持つ産仔を選出し、安定的に本遺伝子が組み込まれた個体を得ることで、個体発生時にすでにtsA58 のラージ T 抗原遺伝子が各組織の細胞の染色体に組み込まれた遺伝子導入ラットを効率よく作製することができる。

次に、この様にして作製した遺伝子導入ラットの各臓器から常法に従い細胞（初代細胞）を取り出して継代培養を繰り返すことで不死化細胞を調製することができる。得られた細胞は33～37℃において永久的増殖能を持ち、39℃においては増殖を停止するため細胞固有の分化形質の発現を制御することができるという特色を持つ。

このラットの眼球より網膜を摘出して細切し、テーバー型テフロン製ホモゲナ

イザーで組織を磨り潰して得られたスラリーを遠心してペレットを得る。得られたペレットを酵素（プロテアーゼ）溶液に懸濁して振とうを加えながら酵素処理を行い、毛細血管を不要な組織から分離させた後、遠心してペレットを得る。得られたペレットから不要な組織を除去するため、25%ウシ血清アルブミンを含むハンクス平衡塩液（HBSS）に懸濁し、遠心により毛細血管ペレットを回収する。得られたペレットを再び酵素溶液に懸濁して酵素処理を行うことで毛細血管を細切した後、培養シャーレーに播種する。2回の継代の後、コロニー形成を行い、増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリソルカップを用いて周囲の細胞から単離し、この操作を2回繰り返して行うことにより、本発明の細胞を単離することができる。単離された細胞は、tsA58のラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質の発現をウエスタンプロティング法で検定することにより、不死化網膜毛細血管内皮細胞と同定することができる。得られた細胞は、50回の継代の後も33°Cにおいて良好な増殖性を示し、網膜毛細血管内皮細胞としての機能を保持した細胞である。

また、このラットの脳を摘出して脈絡叢を採取する。細切した脈絡叢をトリプシン/EDTAで処理して細胞を遊離させ、血清を添加した培養液を加えて、酵素反応を停止させた後、細胞は遠心により回収し、培養液に分散させ、更に、遠心して回収する操作を繰り返して洗浄する。得られた細胞を培養液に分散して培養ペレットに播種し、33°Cで培養し、3回の継代の後コロニー形成を行い、ペニシリソルカップを用いて上皮細胞特有の敷石状の形態を示す増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離する。この操作を2回行うことで、単細胞に由来する細胞を単離する。得られた各細胞について免疫染色を行い、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体の細胞膜上の局在性を、共焦点レーザー顕微鏡で検定して細胞を同定する。得られた細胞はラージT抗原を発現し、50回の継代後も33°Cにおいて良好な増殖性を維持し、さらに $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseとGLUT-1輸送担体の発現を認め、

*membrana serosa*

特に単層培養したときに他の上皮細胞では側底膜側（漿膜側）に存在するNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaseが頂側膜(apical)側の細胞膜上に局在する細胞株である。

また同様に、このラットの脳を摘出して大脳を採取する。細切した大脳をデーバー型テフロンホモゲナイザーで組織を磨り潰して得たスラリーを16%デキストランで遠心してペレット（脳毛細血管画分）を得た。得られた脳毛細血管画分を酵素（コラゲナーゼ/ディスパーゼ）溶液に懸濁して振とうを加えながら酵素処理を行い、毛細血管を不要な組織から分離させた後、遠心してペレットを得る。得られたペレットから不要な組織を除去するため、16%デキストランを含むハンクス平衡塩液（HBSS）に懸濁し、遠心により毛細血管ペレットを回収する。得られたペレットを再び酵素溶液に懸濁して酵素処理を行なうことで毛細血管を細切した後、培養シャーレに播種する。33°C、炭酸ガス培養器内（5% CO<sub>2</sub>-95%、空気、飽和湿度）で培養し、コンフルエントに達した細胞をトリプシン処理により細胞を剥離・分散して継代した。3回の継代後、コロニー形成を行い、増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリソルカップを用いて周囲の細胞から単離し、この操作を2回繰り返して行なうことにより、本発明の細胞を単離することができる。単離された細胞は tsA58 のラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質の発現をウエスタンブロッティング法で検定し、更に、Dil-蛍光標識体のAcLDLの取り込みを共焦点レーザー顕微鏡により観察することでスカベンジャー受容体の発現を認め、アルカリリフォスファターゼとアーグルタミルトランスペプチダーゼ活性を測定して脳毛細血管内皮細胞であると同定することができる。得られた細胞は、50回の継代の後も33°Cにおいて良好な増殖性を示し、脳毛細血管内皮細胞の機能を保持した細胞である。

### 実施例

次に実施例をもって本発明を具体的に説明するが、これらは単に例示したのみであり、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

## 〔実施例 1〕

トランスジェニックラットの作製

SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを導入したトランスジェニックラットは、下記の手順で作製した。

① 導入遺伝子の調製

マイクロインジェクションにはSV40の温度感受性突然変異株 tsA58のDNAを使用した。このDNAは tsA58のゲノムDNAを制限酵素 BamHIで開環し、pBR322の BamHI部位に導入し、Sfi I 配列をSacII に変換してSV40の複製起点(ori)を欠失する ori(-) としたDNAクローンpSVtsA58ori(-)-2 (Ohno T. et al., Cytotechnology 7, 165-172 (1991) Fig. 1参照) から常法に従い調製した。すなわち、大腸菌内で増幅させて得たプラスミドDNAのpSVtsA58ori(-)-2を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で消化した後、アガロースゲル電気泳動 (1% gel; ベーリンガー社製) を用いてベクター部分を分離した5240bpのtsA58 のDNA (直鎖状DNA断片) をゲルから切り出した。アガラーゼ処理 (0.6 unit/100mgゲル: Agarase; ベーリンガー社製) によりゲルを溶解した後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿処理を行いDNAを回収した。回収した精製DNAをTEバッファー (1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.6) に溶解して 170 μg/mLの精製DNA溶液を得た。このDNA溶液を注入用バッファー (0.1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH 7.6) で 5 μg/mLとなるように希釈して注入用DNA溶液を調製した。尚、調製したDNA溶液は注入操作まで -20°Cで保存した。

② トランスジェニックラットの作製

ラット前核期受精卵への上記①で調製した注入用DNA溶液のマイクロインジェクションは下記の要領で行った。性成熟した8週齢のウイスター (Wistar) ラットを明暗サイクル12時間 (4:00~16:00 を明時間) 、温度23±2°C、湿度55±5%で飼育し、腔スメアにより雌の性周期を観察して、ホルモン処理日を選択し

た。先ず、雌ラットに150IU/kgの妊馬血清性性腺刺激ホルモン〔日本ゼンヤク：PMS全葉 (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)〕を腹腔内投与し、その48時間後に75IU/kg のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン〔三共臓器：ペローゲン (human chorionic gonadotropin; hCG)〕を投与して過剰排卵処理を行った後、雄との同居により交配を行った。hCG 投与32時間後に卵管灌流により前核期受精卵を採取した。卵管灌流および卵の培養にはmKRB液 (Toyoda Y. and Chang M. C., J. Reprod. Fertil., 36, 9-22 (1974))を使用した。採取した受精卵を 0.1% ヒアルロニダーゼ (シグマ社製 : Hyaluronidase Type I-S)を含むmKRB液中で37°C、5 分間の酵素処理を行い卵丘細胞を除去した後、mKRB液で 3 回洗浄して酵素を除去し、DNA注入操作まで炭酸ガス培養器内 (5% CO<sub>2</sub>-95% 空気, 37°C, 飽和湿度) に保存した。この様にして準備したラット受精卵の雄性前核にDNA溶液を注入した。注入操作した228 個の卵を 9 匹の仮親に移植して出産させ80匹の産仔を得た。注入DNAのラットへの導入は、離乳直後に断尾して得た尾より調製したDNAを PCR法により検定 [使用プライマー; tsA58-1A, 5'-TCCTAATGTGC AGTCAGGTG-3' (1365～1384部位に相当), tsA58-1B, 5'-ATGACGAGCTTGGCACTTG-3' (1571～1590部位に相当) ] した。その結果、遺伝子の導入を認めた20匹 (雄 6 匹、雌 8 匹、性別不明 6 匹) の産仔を得た。これらの中から性成熟期間を経過する12週齢まで生存した11ラインのトランスジェニックラット (雄ライン; #07-2, #07-5, #09-6, #12-3, #19-5, 雌ライン: #09-7, #11-6, #12-5, #12-7, #18-5, #19-8) を得た。これらのG<sub>0</sub>世代のトランスジェニックラットとウイスター ラットを交配し、雄ファウンダーの 2 ライン (#07-2, #07-5) と雌ファウンダーの 3 ライン (#09-7, #11-6, #19-8)において次世代以降への遺伝子の伝達を確認した。

## 〔実施例 2〕

網膜毛細血管内皮細胞の分離

網膜からの網膜毛細血管内皮細胞の分離は Greenwood の方法 (Greenwood J. (1992) J. Neuroimmun., 39, 123-132) を改良して行なった。実施例 1 で得られた SV40 の温度感受性突然変異株 tsA58 のラージ T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット (1 匹) より眼球を摘出した。クリーンベンチ内で氷冷した調製用緩衝液 (10mM Hepes, 100U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μg/mL streptomycin sulfate, 0.5% ウシ血清アルブミンを含む HBSS) で摘出した眼球をよく洗浄した後、網膜組織を取り取り、組織を 1 ~ 2 mm<sup>3</sup> に細切した。細切した組織を 1 mL 用テーバー型テフロン製ホモゲナイザー (WHEATON 社製) に移し、1 mL の氷冷した調製用緩衝液を加え、4 回のアップダウンのストロークを行い組織をホモゲナイズしてスラリーを得た。得られたスラリーを遠心 (600g, 5 分間, 4 °C) してペレットを得た。得られたペレットを 1 mL の酵素溶液 (0.01% collagenase/dispase (Boehringer Mannheim 社製), 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μg/mL streptomycin sulfate, 20U/mL deoxyribonuclease I, 0.147 μg/mL tosyl-lysine-chloromethylketone を添加した HBSS) に懸濁し、振とうを加えた水浴中で酵素処理 (37°C, 30 分間) を行い、不要な組織から毛細血管を分離した。遠心 (600g, 5 分間, 4 °C) してペレットを得た。

得られたペレットから不要な組織を除去するため、10mL の 25% ウシ血清アルブミンを含む HBSS にペレットを懸濁し、遠心 (1,000g, 15 分間, 4 °C) により毛細血管画分のペレットを得た。得られたペレットを再び 1 mL の酵素溶液に懸濁して酵素処理 (37°C, 30 分間) を行うことで毛細血管を細切した。遠心 (600g, 5 分間, 4 °C) してペレットを得た。次に、得られたペレットを 2 mL の培養液 (15 μg/mL endothelial cell growth factor, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μg/mL streptomycin sulfate, 2.50 μg/mL amphotericin B を添加した DMEM) に分散して 1 枚の collagen type I をコートした 35mm φ 培養シャーレー (Becton Dickinson 社製) に播種した。33°C の炭酸ガス培養器 (5% CO<sub>2</sub>-95% Air, 飽和湿度) で 10 日間培養した。

和湿度) 内で培養(初代培養) した。培地を 1 週間に 2 回交換し、継代はトリプシン液 (0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA; Gibco BRL 社製) を用いておよそ 1 週間隔で行った。2 回の継代の後、 $10^2 \sim 10^3$  個の細胞を collagen type I をコートした 100mm φ 培養シャーレー (Becton Dickinson 社製) に播種した。33°C の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。培地を 1 週間に 2 回交換し、7 ~ 10 日後にコロニーを形成した増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、得られた細胞を再び 100mm φ 培養シャーレーに播種して 33°C の炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。ペニシリンカップを用いて増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離して 5 種の細胞 (TR-iBRB2, TR-iBRB4, TR-iBRB6, TR-iBRB8, TR-iBRB9) を得た。

この TR-iBRB2 を日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術院研究所に寄託した。受託番号は FERM BP-6507 である。

### [実施例 3]

#### ラージ T 抗原タンパク質の確認

実施例 2 で得られた 5 種の細胞におけるラージ T 抗原蛋白質の発現をウエスタンプロット法 (実験医学別冊バイオマニュアル UP シリーズ「分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール」 108 ~ 115 頁, 羊土社, 1995 年発行) により検討した。5 種の細胞 (継代数: 20) を 90mm φ 培養シャーレーで飽和まで培養した。回収した細胞を 3 % SDS-PBS (pH 7.4) で可溶化した後、遠心 (10,000 rpm, 10 分間) して不溶画分を除去した後、ブレッドフォード法 (BIO-RAD 社製プロテインアッセイキット II を使用) で総蛋白質量を定量した。それぞれ 20 μg の蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。3 % スキムミルク溶液でブロッキングしたニトロセルロース膜に 1 次抗体として抗 SV40 ラージ T 抗原マウス抗体 (CALBIOCHEM 社製, DP02-C) を、2 次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham 社製) を反応させ、ラージ T 抗原蛋白

質特異的な反応をアマシャム社製 ECLウエスタンプロティング検出システム (RPN2106M1)を用いて検出した。結果を第1表に示す。表中+はラージT抗原蛋白質に特異的な反応を検出できたことを示す。この結果、5種の細胞株全てにおいてラージT抗原蛋白質の発現を確認した。

第 1 表

細胞	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
T抗原	+	+	+	+	+

## 〔実施例4〕

細胞の同定

実施例2で得られた細胞が網膜毛細血管内皮細胞であることを、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質の発現をウエスタンプロティング法で検定することにより同定した。得られた各細胞について、実施例3と同じ方法で作製したニトロセルロース膜を用いて、1次抗体として抗GLUT-1マウス抗体 (Chemicon社製, Temecula, CA)又は抗p-糖蛋白質ウサギ抗体 (抗mdr抗体、Oncogene Research Products社製)を、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham社製)又はHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Cappel社製)を反応させ、GLUT-1蛋白質あるいはp-糖蛋白質特異的な反応をアマシャム社製 ECLウエスタンプロティング検出システム (RPN2106M1)を用いて検出した。結果を第2表に示す。表中+は、GLUT-1蛋白質又はp-糖蛋白質の発現が確認されたことを示す。この結果、5種の細胞全てにおいてGLUT-1蛋白質及びp-糖蛋白質の発現が確認された。従って、得られた5種の細胞が網膜毛細血管内皮細胞であることが同定された。

第 2 表

細胞	TR-iBRB2	TR-iBRB4	TR-iBRB6	TR-iBRB8	TR-iBRB9
GLUT-1	+	+	+	+	+
P-糖蛋白質	+	+	+	+	+

## 〔実施例 5〕

グルコース輸送能の確認

実施例 2 で得られた細胞 TR-iBRB2 を使用し、3-OMG (3-o-methyl-D-glucose) 取り込み能を測定し、濃度依存的なグルコース輸送能を示すことで機能的な GLUT-1 輸送担体を有することを確認した。即ち、24穴細胞培養用プレートに TR-iBRB 株を  $3 \times 10^5$  /ウェル / mL となるように播き、33°C の炭酸ガス培養器で 24 時間培養して細胞をコンフルエントにした。3-OMG の取り込みの測定は次の要領で行なった。先ず、培地を吸引して除去した後、37°C に温めた 232kBq/mL の [<sup>3</sup>H]3-OMG を含む uptake buffer を 0.2mL 加えた。尚、本実施例において用いた uptake buffer はグルコースを含まないものであり、122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> の溶液を 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub> で 20 分間バブリングして NaOH で pH 7.4 に調整されたもの（以下 uptake buffer ①とする）である。10 秒後に uptake buffer ①を取り除き、4 °C の uptake buffer ①で洗浄した。以下、uptake buffer ①を取り除くまでの時間を 20 秒間、30 秒間、1 分間として同様の操作を行なった。細胞を 1% トライトン X-100 を含む 1 mL の PBS で一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定し、3-OMG の取り込み能の直線性を確認した。結果、20 秒間の取り込み時間を設定した。

次に、3-OMG の取り込みの基質濃度依存性を検討した。細胞を37°Cに温めたuptake buffer ①で洗浄した後、37°Cに温めた462kBq/ ウェルの [<sup>3</sup>H]3-OMG を含む uptake buffer ①を0.2mL 加えた。ただし、非標識体の3-OMG を0, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 50mM含む uptake buffer①を使用して3-OMG の各濃度液とした。20秒後にuptake buffer ①を取り除き、4 °Cの10mM非標識体3-OMG を含む uptake buffer①で洗浄した。次に、1 %トライトンX-100 を含む 1 mLのPBS で一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性を測定した。結果を図1に示す。尚、3-OMG の濃度に対する取り込み速度のプロット式 ( $V=V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$ ;  $V_{max}$  は最大速度定数、  $K_m$  はミカエリス定数、  $[S]$  は基質濃度) を用いて 3-OMG の取り込みの  $K_m$  と  $V_{max}$  を非線形最少二乗法プログラム (Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobio-Dyn., 4, 879-885) を用いて解析した。この結果、GLUT-1の基質である [<sup>3</sup>H]3-OMG の取り込みは濃度依存的であり、そのミカエリス定数 ( $K_m$ )は 5.6mM、最大取り込み速度定数 ( $V_{max}$ )は 45 nmol/min/mg proteinであった。従って、本発明の細胞は、濃度依存的にグルコース輸送能を示すことが確認された。

#### 〔実施例 6〕

##### p - 糖蛋白質の輸送能

実施例 2 で得られた細胞TR-iBRB2が機能的な p - 糖蛋白質輸送担体を持つことを p - 糖蛋白質の基質である cyclosporin A (CyA)の取り込み測定を行い、 p - 糖蛋白質阻害剤である verapamil 共存下での取り込みと比較することで検定した。24穴細胞培養用プレートに細胞TR-iBRB2を  $1 \times 10^5$  / ウェル / mL培地で播種し、 33 °Cの炭酸ガス培養器内で 48 時間培養して細胞をコンフルエントにした。CyA の取り込み測定は以下の要領で行なった。先ず、培地を吸引して除去した後に予め 37°Cに温めたグルコースを含む uptake buffer (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>,

10 mM D-glucose の溶液を 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub> で 20 分間バブリングして、NaOH で pH 7.4 に調整；以下 uptake buffer ②とする) で細胞を洗浄した。次に、37°C に温めた 0.25% DMSO を含む uptake buffer ②を 0.2 mL 加え 30 分間プレインキュベーションした後に uptake buffer ②を除去し、37°C に温めた 37 kBq/mL の [<sup>3</sup>H]CyA と 0.075 μM の非標識 CyA 及び 0.25% DMSO を含む uptake buffer ②を 0.2 mL 加えた。Verapamil 共存下での取り込みは 37°C に温めた 100 μM verapamil, 0.25% DMSO を含む uptake buffer ②を 0.2 mL 加え 30 分間プレインキュベーションした後に uptake buffer ②を除去し、37°C に温めた 37 kBq/mL の [<sup>3</sup>H]CyA と 0.075 μM の非標識 CyA, 100 μM verapamil 及び 0.25% DMSO を含む uptake buffer ②を 0.2 mL 加えた。いずれの取り込み反応も 30 分間行なった。反応液を除去後、4 °C の uptake buffer ②で 3 回洗浄した後に 1 mL の 1N-NaOH を加えて一晩可溶化し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。その結果 p-糖蛋白質の基質である [<sup>3</sup>H]CyA の細胞／培地の取り込み比は 270 μL/mg protein であるのに對し、p-糖蛋白質の阻害剤である 100 μM の Verapamil 共存下で [<sup>3</sup>H]CyA の細胞／培地の取り込み比は 490 μL/mg となり、約 1.8 倍の有意な取り込みの増加が見られた。また、他の細胞でも同様の結果が得られた。

#### 〔実施例 7〕

##### スカベンジャー受容体の機能確認

実施例 2 で得られた細胞 TR-iBRB2 が機能的なスカベンジャー受容体を持つことを、蛍光標識体である 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate 標識アセチル化 LDL (Dil-Ac-LDL, Biomedical Technologies, Stoughton, MA) の取り込みを測定することで解析した。カバーグラスに細胞 TR-iBRB2 を  $1 \times 10^5$  / ウエル / mL 培地で播種し、33°C の炭酸ガス培養器内で 48 時間 培養して細胞をコンフルエントにした。Dil-Ac-LDL の取り込み測定は以下の要領で行なった。先ず、培地を吸引して除去した後に予め 37°C に温めた uptake buff

er②で細胞を洗浄した。次に、37°Cに温めた 10  $\mu$ g/200  $\mu$ L の Dil-Ac-LDLを含む uptake buffer②を 0.2 mL 加え30分間炭酸ガス培養器でインキュベーションした。4 時間後に uptake buffer②を除去し、4 °Cの uptake buffer②で3回洗浄した。次に、3 % formaldehyde/PBS を加え20分間室温に保持して固定したものを共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内に取り込まれた蛍光を測定した。その結果、スカベンジャー受容体のリガンドである 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorateで標識されたアセチル化LDL (Dil-Ac-LDL)が細胞内に取り込まれていることを確認した。また、他の細胞でも同様の結果が得られた。

#### [実施例 8]

##### 脈絡叢上皮細胞の分離

実施例 1 で得られた、SV40の温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット（1匹）より、クリーンベンチ内で清潔に脳を摘出した。得られた脳の左右の側脳室の内側壁から第三脳室の上壁まで続く脈絡叢を採取し、PBSでよく洗浄した後、2 mLの氷冷したPBS 中で組織を 1 ~ 2 mm<sup>3</sup> に細切した。細切した組織を1 mLの10X トリプシン/EDTA 溶液 (0.5% Trypsin/5.3mM EDTA; Gibco BRL 社製) に懸濁して酵素処理 (37°C, 20分間) を行った。ときどき軽く攪拌することで細切した組織を分散させた。得られた細胞を培養液 (10% FCS, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100  $\mu$ g/mL streptomycin sulfate を含むDMEM) で洗浄した。次に、2 mLの培養液に分散して1枚の35mm  $\phi$  培養シャーレー (Falcon; Becton Dickinson社製) に播種し、33°Cの炭酸ガス培養器 (5% CO<sub>2</sub>-95% Air, 飽和湿度) 内で培養 (初代培養) した。培地を1週間に2回交換し、継代はトリプシン/EDTA 液 (0.05% Trypsin/0.53mM EDTA; GibcoBRL 社製) を用いておよそ1週間隔で行った。3回の継代の後、10<sup>2</sup> ~ 10<sup>3</sup> 個の細胞を10cm  $\phi$  培養シャーレーに播種して33°Cの炭酸ガス培養器内で培養して

コロニー形成を行った。培地を1週間に2回交換し、7～10日後に上皮細胞特有の敷石状の形態を示す細胞からなるコロニーを形成した増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリンカップを用いて周囲の細胞から単離し、得られた細胞を再び10cm $\phi$  培養シャーレーに播種して33°Cの炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。ペニシリンカップを用いて増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離して5種の細胞(TR-CSFB1, TR-CSFB2, TR-CSFB3, TR-CSFB4, TR-CSFB5)を得た。

このTR-CSFB3を日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。受託番号はFERM BP-6508である。

#### [実施例9]

##### ラージT抗原タンパク質の確認

実施例8で得られた5種の細胞のラージT抗原蛋白質を、ウエスタンプロット法（実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ「分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール」108～115頁、羊土社、1995年発行）により検討した。5種の細胞（継代数：10）を90mm $\phi$  培養シャーレーで飽和まで培養した。回収した細胞を1mLの3%SDS-PBS(pH7.4)で可溶化した後、遠心(10,000rpm, 10分間)して不溶画分を除去した後、ブラッドフォード法(BIO-RAD社製プロテインアッセイキットIIを使用)で総蛋白質量を定量した。それぞれ20 $\mu$ gの蛋白質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。3%スキムミルク溶液でブロッキングしたニトロセルロース膜に1次抗体として抗SV40ラージT抗原マウス抗体(DP02-C、CALBIOCHEM社製)を、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体(Amersham社製)Aを反応させ、ラージT抗原蛋白質特異的な反応をアマシャム社製ECLウエスタンプロティング検出システム(RPN2106M1)を用いて検出した。結果を第3表に示す。この結果、得られた5種の細胞全てにおいてラージT抗原蛋白質を確認した。

第 3 表

細胞	TR-CSFB1	TR-CSFB2	TR-CSFB3	TR-CSFB4	TR-CSFB5
T 抗原	+	+	+	+	+

## 〔実施例 10〕

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaseとGLUT-1輸送担体の確認

得られた各細胞を単層培養し、細胞膜に発現されたNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase及びGLUT-1輸送担体を免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認した。実施例8で得られた細胞TR-CSFB3を35mmφディッシュ (Falcon) のコラーゲンコートカバーグラスの上に培養した。培養液を除去し、細胞をPBSで洗浄した後、4mLの固定液 (3% paraformaldehyde, 2% sucroseを添加したPBS)を加え室温で15分間放置後、PBSでよく洗浄した。2mLのブロッキング液 (Block Ace; 大日本製薬社製)を加え、37°Cで1時間放置してブロッキングした後、1次抗体 (抗Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase $\beta$ 2ウサギ抗体; UBI社製、又は抗GLUT-1ウサギ抗体; Chemicon社製)を室温で1時間反応させた。PBSで4回洗浄後、2次抗体 (FITCラベル抗ウサギIgG; Capel社製)を室温で1時間反応させ、PBSで4回洗浄した。最後に、ラベル化した細胞をグリセリン封入液 (90% glycerolとなるようにPBSを加えた後、Perm a Fluor (Lipshaw社製)を0.1(V/V)% 添加したもの)で封入し、マニキュアにてカバーグラスの周囲を封入した。観察は、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (CLSM; Swiss LSM 410, Swiss社製)で行なった。この結果、第2図に示すように、細胞 TR-CSFB3 でNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase及びGLUT-1の発現を認め、特に、他の上皮細胞では側底膜側 (漿膜側) に存在するNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaseが頂側膜 (apical) 側の細胞膜上に局在することから、得られた細胞が脈絡叢上皮細胞株であると同定した。尚、

他の細胞においても同様の結果が得られた。

[実施例 11]

プロリン輸送機能の確認

得られた細胞のL-プロリンの輸送に対する濃度依存性を調べてL-プロリンの輸送能を求め、既報の脈絡叢におけるL-プロリンの輸送能と比較することで、得られた細胞が脈絡叢上皮細胞としての機能を保持することを確認した。

実施例8で得られた細胞TR-CSFB3を24穴細胞培養用プレートに $3 \times 10^5$ /ウェル/mL となるように播き、33°Cの炭酸ガス培養器で24時間培養して細胞をコンフルエントにした。先ず、培地を吸引して除去した後、37°Cに温めた uptake buffer ① (122 mM NaCl, 3 mM KC1, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.4 mM K<sub>2</sub>HP<sub>4</sub>, 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> の溶液を5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub> で20分間バブリングしてNaOHでpH7.4に調整)で細胞を洗浄した。185KBq/mL の [<sup>3</sup>H]-L-proline を含む37°Cに温めた0.2 mLの uptake buffer ①を加えた。ただし、各プロリン濃度の uptake buffer ①は、非標識体のL-プロリンで0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20mMとなるように調製した。30分間の取り込み反応を行なわせ、細胞をPBSで3回洗浄した後、1 mLの1%トライトンX-100 を含む1 mLのPBSを加え、室温で一晩静置して可溶化し、液体シンチレーションカウンター(Beckmann社製LS-6500)を用いて放射活性を測定した。又、タンパク質量をBio-Rad社製DCプロテインアッセイキットを用いて測定した。L-プロリンの濃度に対する取り込み速度のプロット式( $V = V_{max} \times [S] / (K_m + [S])$ );  $V_{max}$ は最大速度定数、 $K_m$ はミカエリス定数、[S]は基質濃度)を用いてL-プロリンの取り込みの $K_m$ 及び $V_{max}$ を非線形最少二乗法プログラムMULTI (Yamaoka K. et al. (1981) J. Pharmacobi-Dyn., 4, 879-885)を用いて解析した。結果を第3図に示す。この結果、L-プロリン ([<sup>3</sup>H]-L-proline) の取り込みは濃度依存的であり、その $K_m$ 値は1.5 mM、 $V_{max}$ 値は2.4 nmol/min/mg protein であった。求めた $K_m$ 値は、家兔

脈絡叢での報告された値の1.1 mM (Coben L.A. et al. (1972) Brain Res., 30, 67-82) と近似した。このことから、得られた細胞が脈絡叢上皮細胞株の機能を保持することを確認した。

#### [実施例 1 2]

##### コリン、ウアバインによるプロリン能動輸送の阻害

単離脈絡叢におけるL-プロリンの取り込みはNa<sup>+</sup> 依存性であることから、得られた細胞におけるL-プロリンの取り込みのNa<sup>+</sup> 依存性を確認して、得られた細胞が脈絡叢上皮細胞としての機能を保持することを、実施例 1 1と同様の方法により確認した。ただしNa<sup>+</sup> -free 条件下でおこなうためuptake buffer ①の組成中のNa<sup>+</sup> をすべてcolineに置換したものを用いた。又、ウアバインの効果を調べる（ウアバインはNa<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> ATPaseの阻害剤であるため、Na<sup>+</sup> の濃度勾配が消失する）場合には、1mM ウアバインを添加したトレーサーを含む uptake buffer①を使用した。いずれも30分間の反応を行なった。結果を第4図に示す。Na<sup>+</sup> -free 条件下ではL-プロリンの取り込みが98%阻害された。又、1 mMウアバインによりL-プロリンの取り込みが56%の阻害された。この結果から、細胞TR-CSFB3におけるL-プロリンの取り込みはNa<sup>+</sup> 依存性であることが示された。このことから、得られた細胞が脈絡叢上皮細胞株の機能を保持することを確認した。

#### [実施例 1 3]

##### 脳毛細血管内皮細胞の分離

ラット脳からの毛細血管内皮細胞の分離は実施例 2 に示した方法に準じて次の手順で行なった。実施例 1 で得たSV40の温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニックラット（1匹）より大脳を摘出した。クリーンベンチ内で摘出した大脳を氷冷した調製用緩衝液（10 mM Hepes, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 µg/mL streptomycin sulfate, 0.5% ウシ血清アルブミンを含むHBSS）でよく洗浄した後、大脳を1～2 mm<sup>3</sup> に細切し、

1 mL用テーパー型テフロン製ホモゲナイザー (WHEATON 社製) に移し、1 mLの氷冷した調製用緩衝液を加え、4回のアップダウンのストロークを行い組織をホモゲナイズしてスラリーを得た。得られたスラリーを遠心 (600g, 5分間, 4°C) してペレットを得た。得られたペレットを1 mLの酵素溶液 (0.01% collagenase/ dispase (Boehringer Mannheim社製), 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μg/mL streptomycin sulfate, 20 U/mL deoxyribonuclease I, 0.147 μg/mL tosyl-lysine-chloromethylketone を添加したHBSS) に懸濁し、振とうを加えた水浴中で酵素処理 (37°C, 30分間) を行い、不要な組織から毛細血管を分離した。遠心 (600g, 5分間, 4°C) してペレットを得た。得られたペレットから不要な組織を除去するため、10 mLの16%デキストランを含むHBSSにペレットを懸濁し、遠心 (1,000g, 15分間, 4°C) により毛細血管画分のペレットを得た。得られたペレットを再び1 mLの酵素溶液に懸濁して酵素処理 (37°C, 30分間) を行うことで毛細血管を細切した。遠心 (600g, 5分間, 4°C) してペレットを得た。次に、得られたペレットを2 mLの培養液 (15 μg/mL endothelial cell growth factor, 100 U/mL benzylpenicillin potassium, 100 μg/mL streptomycin sulfate, 2.50 μg/mL amphotericin Bを添加したDMEM) に分散して1枚の collagen type I をコートした35 mmφ培養シャーレー (Becton Dickinson社製) に播種した。33°Cの炭酸ガス培養器 (5% CO<sub>2</sub>- 95% Air, 鮫和湿度) 内で培養 (初代培養) した。培地を1週間に2回交換し、継代はトリプシン液 (0.05% Trypsin, 0.53mM EDTA; Gibco BRL社製) を用いて細胞を剥離し、細胞を分散播種した。継代はおよそ1週間隔で行った。3回の継代の後、10<sup>2</sup> ~ 10<sup>3</sup> 個の細胞を collagen type Iをコートした100 mmφ培養シャーレー (Becton Dickinson社製) に播種した。33°Cの炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。培地を1週間に2回交換し、7 ~ 10日後にコロニーを形成した増殖速度の比較的速いコロニーをペニシリソルカップを用いて周囲の細胞から単離し、得られた細胞を再び10

0 mmφ 培養シャーレーに播種して33°Cの炭酸ガス培養器内で培養してコロニー形成を行った。ペニシリソウカップを用いて増殖速度の比較的速いコロニーを周囲の細胞から単離して5種の細胞株 (TR-BBB1 TR-BBB5 TR-BBB6 TR-BBB11 TR-BBB13)を得た。これらの細胞株は内皮細胞特異的なスピンドルファイバー状の形態を示した。

[実施例14]

ラージT抗原タンパク質の確認

実施例13で得られた5種の細胞株におけるラージT抗原蛋白質の発現をウエスタンプロット法 (実験医学別冊バイオマニュアルUPシリーズ「分子生物学的アプローチによる癌研究プロトコール」 108~115頁, 羊土社, 1995年発行)により検討した。5種の細胞株 (継代数: 20) を90mmφ 培養シャーレーで飽和まで培養した。回収した細胞を3% SDS-PBS (pH7.4) で可溶化した後、遠心 (10,000 rpm, 10分間) して不溶画分を除去した後、ブラッドフォード法 (BIO-RAD社製プロテインアセキットIIを使用) で総蛋白質量を定量した。それぞれ20 μgの蛋白質を SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後、ニトロセルロース膜に転写した。3%スキムミルク溶液でブロッキングしたニトロセルロース膜に1次抗体として抗SV40ラージT抗原抗体 (CALBIOCHEM社製, DP02-C) を、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体 (Amersham社製) を反応させ、ラージT抗原蛋白質特異的な反応をアマシャム社製ECLウエスタンプロティング検出システム (RPN2106M1)を用いて検出した。5種の細胞株全てにおいてラージT抗原蛋白質の発現を確認した。

第 4 表

細胞	TR-BBB1	TR-BBB5	TR-BBB6	TR-BBB11	TR-BBB13
----	---------	---------	---------	----------	----------

T抗原	+	+	+	+	+
-----	---	---	---	---	---

## 〔実施例15〕

細胞の同定

実施例13で得られた細胞株が脳毛細血管内皮細胞であることを、GLUT-1輸送担体およびp-糖蛋白質の発現をウエスタンプロティング法で検定した。得られた各細胞株について、実施例14と同じ方法で作製したニトロセルロース膜を用いて、1次抗体として抗マウスGLUT-1抗体（Chemicon社製、Temecular, CA）又は抗p-糖蛋白質ウサギ抗体（抗mdr抗体、Oncogene Research Products社製）を、2次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体（Amersham社製）又はHRP標識抗ウサギIgG抗体（Cappel社製）を反応させ、GLUT-1蛋白質あるいはp-糖蛋白質特異的な反応をアマシャム社製ECLウエスタンプロティング検出システム（RPN2106M 1）を用いて検出した。5種の細胞株全てにおいてGLUT-1蛋白質及びp-糖蛋白質の発現が確認された。従って、得られた5種の細胞が脳毛細血管内皮細胞であることが同定された。

第5表

細胞	TR-BBB1	TR-BBB5	TR-BBB6	TR-BBB11	TR-BBB13
GLUT-1	+	+	+	+	+
p-糖蛋白質	+	+	+	+	+

## 〔実施例16〕

グルコース輸送能の確認

実施例13で得られた細胞株 TR-BBB1, TR-BBB5, TR-BBB6, TR-BBB11, TR-BBB

13が機能的なGLUT-1輸送担体を持つことを先に記載した実施例5の方法より3-OMG (3-o-methyl-D-glucose) 取り込み測定を行い、濃度依存的なグルコース輸送能を示すことで確認した。GLUT-1の基質である $[^3\text{H}]$ 3-OMG の取り込みは濃度依存的であり、その初期取り込み速度を7.07-10.2  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$ であった。

第 6 表

細胞	取り込み初速度 ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$ )	
TR-BBB1	8.12	± 0.62
TR-BBB5	10.1	± 1.32
TR-BBB6	7.07	± 0.92
TR-BBB11	10.2	± 0.62
TR-BBB13	8.96	± 0.50

## 〔実施例 17〕

スカベンジャー受容体機能の確認

実施例13で得られた細胞株TR-BBB13が機能的なスカベンジャー受容体を持つことを、蛍光標識体である 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate標識アセチル化 LDL (Dil-Ac-LDL, Biomedical Technologies, Stoughton, MA) の取り込みを測定することで解析した。実施例7に示した方法に準じて行なった。カバーガラスに細胞株TR-BBB13を  $1 \times 10^5$  /ウェル / mL培地で播種し、33°Cの炭酸ガス培養器内で48時間培養して細胞をコンフルエンスにした。Dil-Ac-LDLの取り込み測定は、先ず、培地を吸引して除去した後に予め37°Cに温めた uptake buffer② (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM Hepes, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-glucos

e の溶液を5%CO<sub>2</sub>-95%O<sub>2</sub> で20分間バブリングして、NaOHで pH7.4に調整) で細胞を洗浄した。次に、37°Cに温めた 10 μg/200 μL のDil-Ac-LDLを含む uptake buffer②を 0.2mL加え30分間炭酸ガス培養器でインキュベーションした。4時間後に uptake buffer②を除去し、4 °Cの uptake buffer②で3回洗浄した。次に、3% formaldehyde/PBS を加え20分間室温に保持して固定したものを共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内に取り込まれた蛍光を測定した。その結果、スカベンジャー受容体のリガンドである1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate で標識されたアセチル化 LDL(Dil-Ac-LDL)が細胞内に取り込まれていることを確認した。また、他の細胞株でも同様の結果が得た。

#### [実施例 18]

##### アルカリリフォスファターゼ及びαグルタミルトランスペプチダーゼ活性の確認

実施例 13 で得られた細胞株が脳毛細血管内皮細胞に発現しているアルカリリフォスファターゼ活性及びαグルタミルトランスペプチダーゼ活性を発現することを常法に従い測定した。測定には、アルカリ性ホスファ B-テストワコー及びα-GTP- テストワコー (和光純薬社製) を使用し、それぞれのキットに記載された標準測定法に従って測定した。尚、タンパク質量は、ブレッドフォード法 (プロテインアッセイキット II; BIO-RAD社製) により測定した。

アルカリリフォスファターゼ活性及びαグルタミルトランスペプチダーゼ活性はラット脳毛細血管リッチ画分(Brain Capillaries) を対照に、それぞれ 8.7-25.8%及び 5.4-22.6%を示し、脳毛細血管内皮細胞特異酵素の発現を認めた。

第 7 表

細胞	アルカリリフォスファターゼ活性		αグルタミルトランスペプチダーゼ活性	
	μU/mg protein (対照比%)	μU/mg protein (対照比%)	μU/mg protein (対照比%)	μU/mg protein (対照比%)
TR-BBB1	23.7 ± 7.17 (25.8%)		3.62 ± 0.47 (12.4%)	

TR-BBB5	11.9	± 2.92 (13.0%)	2.05	± 0.76 ( 7.0%)
TR-BBB6	22.3	± 8.78 (24.3%)	1.58	± 0.52 ( 5.4%)
TR-BBB11	8.05	± 2.37 (8.7%)	6.60	± 0.93 (22.6%)
TR-BBB13	13.7	± 3.92 (14.9%)	5.60	± 1.08 (19.1%)
対照 (Brain Capillaries)	91.8	± 30.8 (100%)	29.2	± 11.8 (100%)

### 産業上の利用の可能性

本発明により、網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞が提供される。また、SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトラスジエニック動物の網膜組織をホモゲナライズして毛細血管を分離し、得られた網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養することによって不死化細胞の樹立方法が提供される。

本発明のこのような樹立細胞は、(シャーレー上で培養すると表裏極性を持つ網膜毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため)網膜毛細血管内皮細胞への薬物の取り込み試験により網膜への薬物透過の予測、網膜実質における各種因子や栄養物質の供給と代謝に関する研究、網膜毛細血管内皮細胞に存在する選択的物質透過の輸送機構研究、網膜毛細血管内皮細胞に対する薬物の毒性研究などに用いることができる。また、グリア細胞の一種のミューラ細胞との共培養により、血液網膜関門を試験管内で再構築することができる。従って、本発明の細胞は、医薬品の安全性あるいは有効性に関するスクリーニング、眼内の恒常性維持や網膜組織の機能障害に関連する疾患の診断あるいはその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

さらに本発明により、脈絡叢上皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単

層培養したときに頂側膜(apical)側に  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase が局在する樹立細胞が提供される。また、SV40 温度感受性突然変異株 tsA58 のラージ T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢組織をプロテアーゼ処理することを特徴とする、不死化細胞の樹立方法が提供される。

本発明のこのような樹立細胞は、多孔性平面膜上で単層培養すると細胞が相互に結合して閉鎖帶を形成し、表裏極性をもつ血液脳脊髄液関門を試験管内で再構築することができるため、脳の栄養代謝研究、脳内への薬物透過研究、脳脊髄での物質代謝あるいは透過の防御機構の研究等に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝あるいは恒常性機能障害に関連する疾患の診断及びその治療方法の開発を細胞レベルで研究するのに有用である。

また、本発明により、脳毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原遺伝子を発現し、GLUT-1 輸送担体、及び  $\text{p}-$  糖蛋白質を発現する樹立細胞株が提供される。さらにまた、SV40 温度感受性突然変異株 tsA58 のラージ T 抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の大脳組織をホモゲナライズして毛細血管を分離し、得られた脳毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養することによって不死化細胞の樹立方法が提供される。

本発明のこのような樹立細胞は、シャーレー上で培養すると脳毛細血管内皮細胞の単一層が得られるため、血液脳関門を試験管内で再構築することができ、脳毛細血管中の血液から脳組織への物質移行を制限している血液脳関門の研究、即ち、脳の栄養代謝研究や脳内への薬物透過研究および血液脳関門における防御機構の研究に活用することができる。従って、医薬品の安全性や有効性に関するスクリーニング、脳の栄養代謝及び恒常性機能障害に関連する疾患の診断やその治療方法の開発の細胞レベルでの研究に有利である。

寄託された微生物への言及

## 1. イ. 当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

名 称； 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名； 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-3566）

## ロ. 寄託機関に寄託した日付

平成10年(1998)年9月18日

## ハ. 寄託機関の寄託について付した受託番号

FERM BP-6507

## 2. イ. 当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

名 称； 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名； 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-3566）

## ロ. 寄託機関に寄託した日付

平成10年(1998)年9月18日

## ハ. 寄託機関の寄託について付した受託番号

FERM BP-6508

## 3. イ. 当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

名 称； 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名； 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-3566）

## ロ. 寄託機関に寄託した日付

平成11年(1999)年9月22日

## ハ. 寄託機関の寄託について付した寄託番号

FERM BP-6873

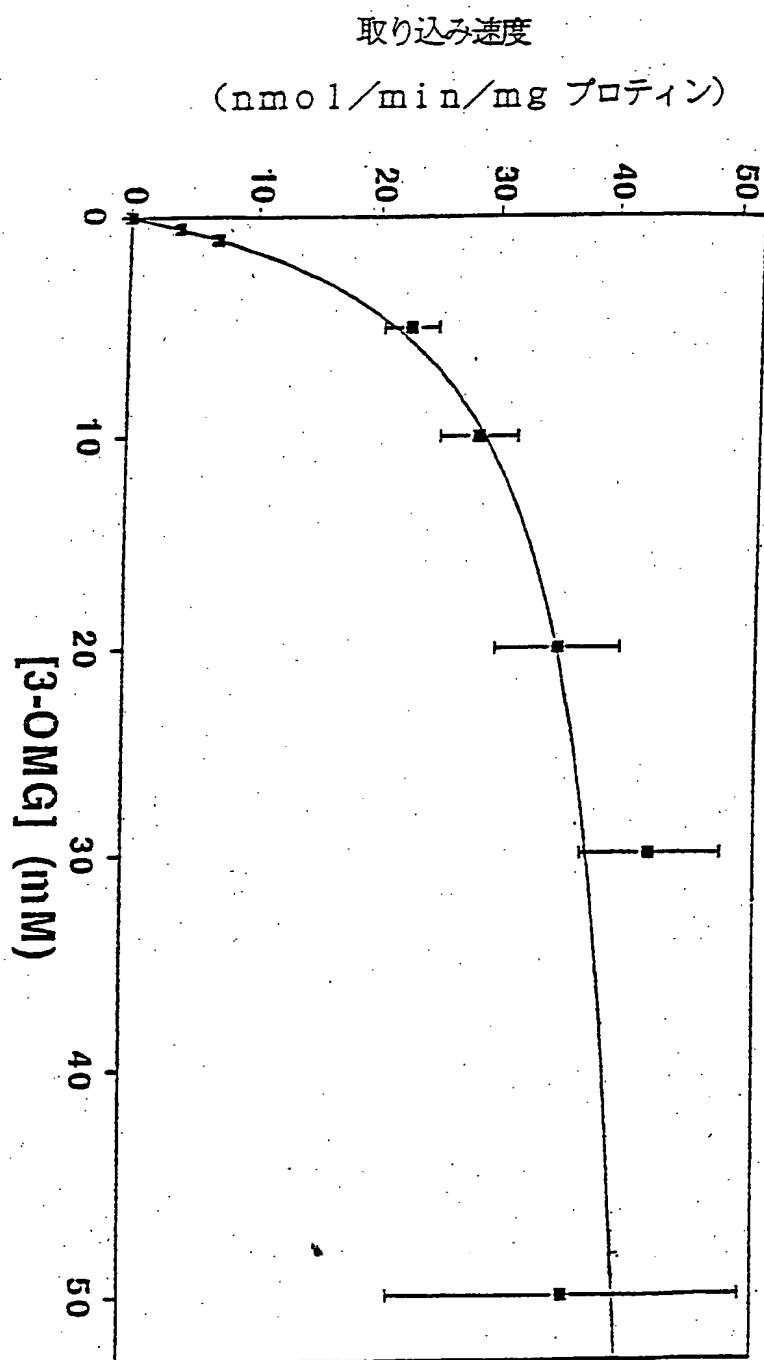
## 請求の範囲

1. SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物から樹立された不死化細胞。
2. トランスジェニック動物がラットである、請求項1記載の樹立された不死化細胞。
3. 網膜毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子、GLUT-1輸送担体、及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞。
4. 受託番号がFERM BP-6507である、請求項3記載の樹立細胞。
5. SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られた細胞を継代培養して不死化細胞を得ることを特徴とする、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質を発現する不死化細胞の樹立方法。
6. SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の網膜毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して得られる、温度感受性SV40ラージT抗原、GLUT-1輸送担体及びp-糖蛋白質を発現する樹立細胞。
7. 脈絡叢上皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側に $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPaseが局在する樹立細胞。
8. 受託番号がFERM BP-6508である、請求項7記載の樹立細胞。
9. (受託番号が)SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランスジェニック動物の脈絡叢上皮組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して不死化細胞を得ることを特徴とする、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在

し、単層培養したときに頂側膜(apical)側にNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaseが局在する、不死化細胞の樹立方法。

10. SV40温度感受性突然変異株 tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランジェニック動物の脈絡叢上皮組織をプロテアーゼ処理し、得られる細胞を継代培養して得られる、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子を発現し、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase及びGLUT-1輸送担体が細胞膜に局在し、単層培養したときに頂側膜(apical)側にNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPaseが局在する樹立細胞。
11. 脳毛細血管内皮細胞由来であって、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子、GLUT-1輸送担体、p-糖蛋白質、アルカリリフォスファターゼ、及び $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼを発現する樹立細胞。
12. 受託番号がFERM BP-6873である、請求項11記載の樹立細胞。
13. SV40温度感受性突然変異株tsA58のラージT抗原遺伝子を導入したトランジェニック動物の脳毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られた細胞を継代培養して不死化細胞株を得ることを特徴とする、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子、GLUT-1輸送担体、p-糖蛋白質、アルカリリフォスファターゼ、及び $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼを発現する不死化細胞の樹立方法。
14. SV40温度感受性突然変異株tsA58 のラージT抗原遺伝子を導入したトランジェニック動物の脳毛細血管をプロテアーゼ処理し、得られた細胞を継代培養して不死化細胞株を得ることを特徴とする、温度感受性SV40ラージT抗原遺伝子、GLUT-1輸送担体、p-糖蛋白質、アルカリリフォスファターゼ、及び $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼを発現する樹立細胞。

第1図





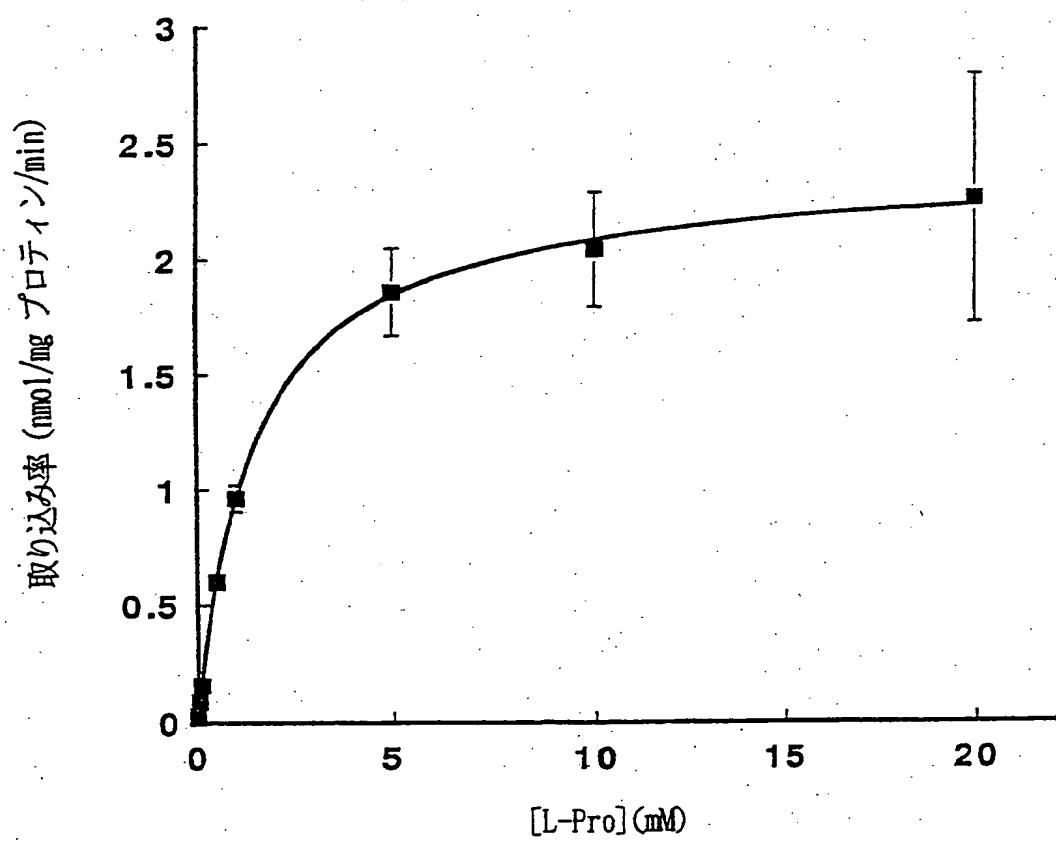
第2図



— 顶側膜(apical)側  
— 側底膜(漿膜)側

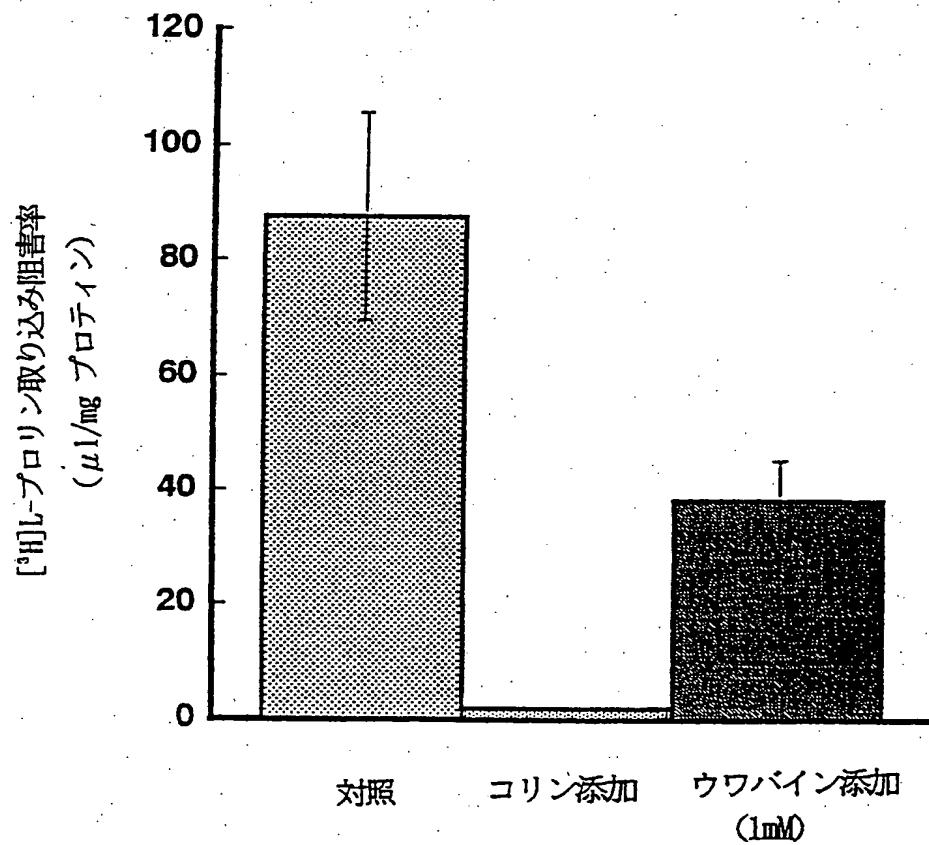


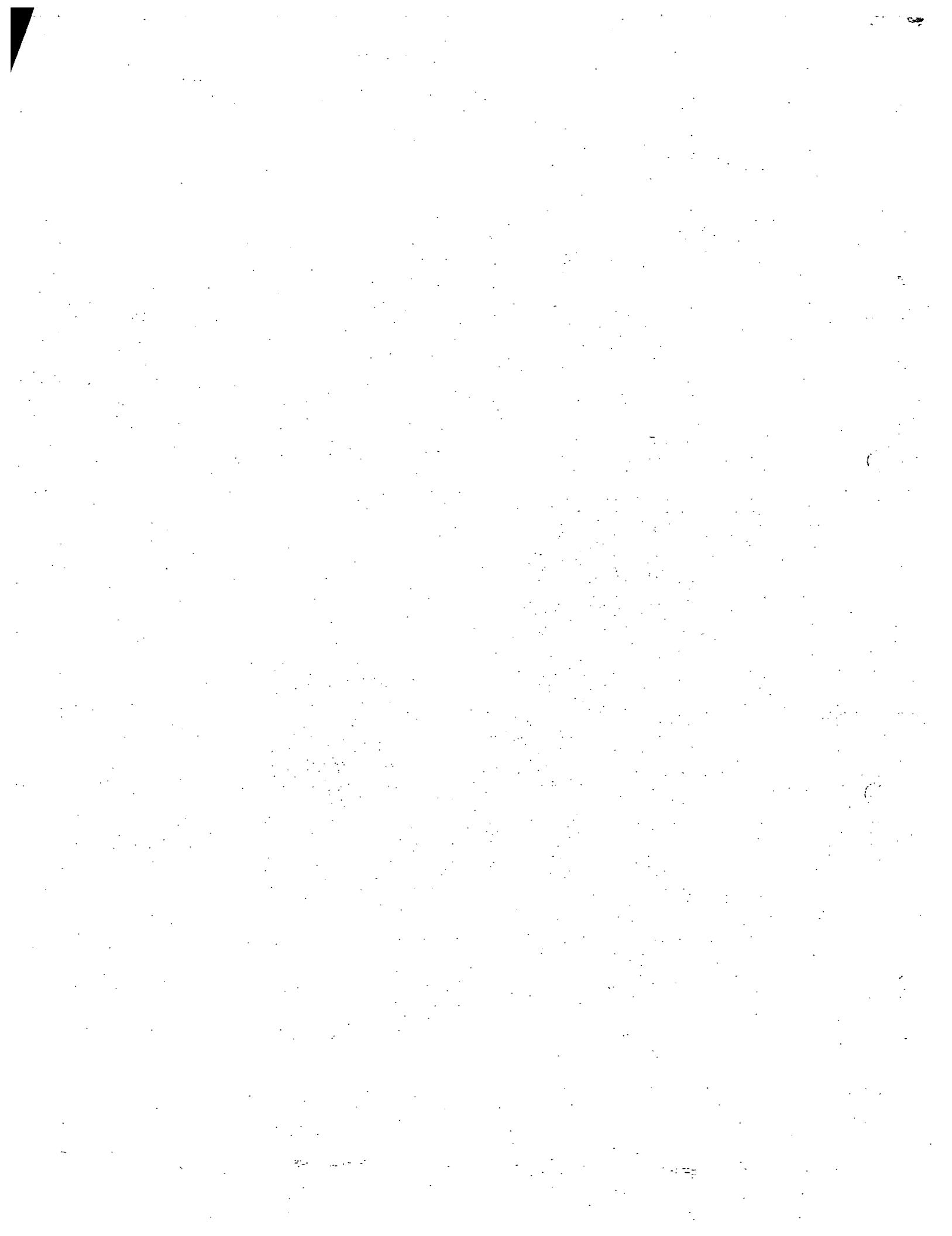
第3図





第4図





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05423

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/37, C12N 5/16, C12N 5/18, C12N 15/63,  
A01K 67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/37, C12N 5/16, C12N 5/18, C12N 15/63,  
A01K 67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NOBLE, M. et al., "The H-2KbtsA58 transgenic mouse: a new tool for the rapid generation of novel cell lines", Transgenic Research (1995), Vol. 4, No. 4, pages 215-225	1, 2
Y	Kazuhisa Hayakawa et al., "The cultured capillary endothelial cells derived from bovine retinas -the change in forms by adding glucose-", New Ophthalmology (1988), Vol. 5, No. 6, pages 931-936	3-14
Y	GILLIES, M. C. et al., "Effect of high glucose on permeability of retinal capillary endothelium in vitro", Investigative Ophthalmology & Visual Science (1997), Vol. 38, No. 3, pages 635-642	3-6
Y	RAMANATHAN, V. K. et al., "Primary cell culture of the rabbit choroid plexus: an experimental system to investigate membrane transport", Pharmaceutical Research (1996), Vol. 13, No. 6, pages 952-956	7-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 December, 1999 (20.12.99)Date of mailing of the international search report  
28 December, 1999 (28.12.99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05423

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HAKVOORT, A. et al., "The polarity of choroid plexus epithelial cells in vitro is improved in serum-free medium", Journal of Neurochemistry (Sept. 1998), Vol. 71, No. 3, pages 1141-1150	7-10
Y	Takashi Tsuruo, "Molecular structure and physiological system of the resistance of anticancer drug - Effects on blood-brain barrier", Pharmacology magazine (1995), Vol. 115, No. 7, pages 513-522	11-14
Y	HOHEISEL, D. et al., "Hydrocortisone reinforces the blood-brainbarrier properties in a serum free cell culture system", Biochemical and Biophysical Research Communications (March, 1998), Vol. 244, No. 1, pages 312-316	11-14

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/37, C12N 5/16, C12N 5/18, C12N 15/63,  
A01K 67/027

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/37, C12N 5/16, C12N 5/18, C12N 15/63,  
A01K 67/027

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST ファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	NOBLE, M. et al. "The H-2K <sup>b</sup> tsA58 transgenic mouse: a new tool for the rapid generation of novel cell lines", Transgenic Research (1995) Vol. 4, No. 4, p. 215-225	1, 2 3-14
Y	早川 和久 他 "ウシ網膜由来培養血管内皮細胞-糖負荷による形態の変化-", あたらしい眼科 (1988) 第5巻, 第6号, p. 931-936	3-6
Y	GILLIES, M.C. et al. "Effect of high glucose on permeability of retinal capillary endothelium in vitro", Investigative Ophthalmology & Visual Science (1997) Vol. 38, No. 3, p. 635-642	3-6

C欄の続きにも文献が挙げられている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.12.99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4B 9735

(印)

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	RAMANATHAN, V. K. et al. "Primary cell culture of the rabbit choroid plexus: an experimental system to investigate membrane transport", Pharmaceutical Research (1996) Vol. 13, No. 6, p. 952-956	7-10
Y	HAKVOORT, A. et al. "The polarity of choroid plexus epithelial cells in vitro is improved in serum-free medium", Journal of Neurochemistry (Sept. 1998) Vol. 71, No. 3, p. 1141-1150	7-10
Y	鶴尾 隆 "抗がん剤耐性の分子機構と生理機構 -血液脳関門への関与", 薬学雑誌 (1995) 第115巻, 第7号, p. 513-522	11-14
Y	HOHEISEL, D. et al. "Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system", Biochemical and Biophysical Research Communications (March, 1998) Vol. 244, No. 1, p. 312-316	11-14